

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



28 SEP 2004



(43) 国際公開日
2003 年 10 月 9 日 (09.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/083106 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/00, C12Q 1/68, G01N 33/50

東京都 中央区 日本橋浜町 2 丁目 6 2 番 5 号 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/03953

(22) 国際出願日: 2003 年 3 月 28 日 (28.03.2003)

(72) 発明者; および

(25) 国際出願の言語: 日本語

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 堀田 佳之 (HOTTA, Yoshiyuki) [JP/JP]; 〒103-0007 東京都 中央区 日本橋浜町 2 丁目 6 2 番 5 号 富士レビオ株式会社内 Tokyo (JP). 長谷川 亜矢子 (HASEGAWA, Ayako) [JP/JP]; 〒〒103-0007 東京都 中央区 日本橋浜町 2 丁目 6 2 番 5 号 富士レビオ株式会社内 Tokyo (JP). 伊藤 哲 (ITO, Satoru) [JP/JP]; 〒103-0007 東京都 中央区 日本橋浜町 2 丁目 6 2 番 5 号 富士レビオ株式会社内 Tokyo (JP).

(26) 国際公開の言語: 日本語

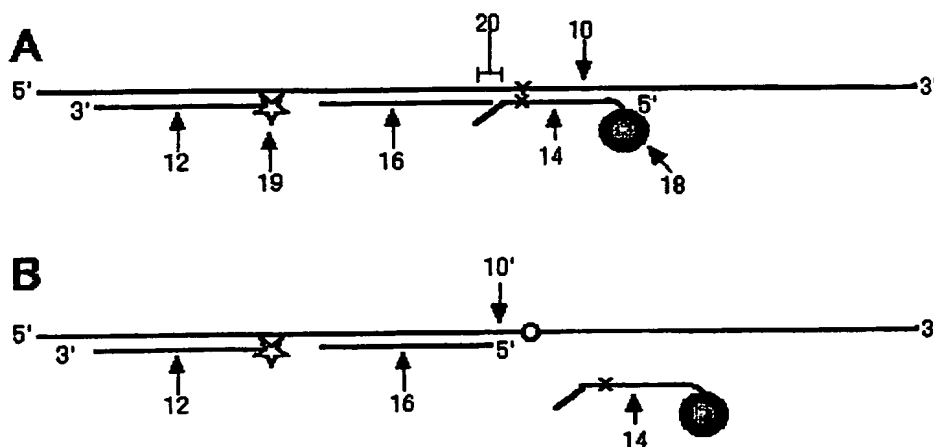
(30) 優先権データ:
特願2002-097407 2002 年 3 月 29 日 (29.03.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 富士レビオ株式会社 (FUJIREBIO INC.) [JP/JP]; 〒103-0007

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF ASSAYING TARGET NUCLEIC ACID AND KIT THEREFOR

(54) 発明の名称: 標的核酸の測定方法及びそのためのキット



(57) Abstract: A method of assaying a target nucleic acid whereby an SNP can be detected or a target nucleic acid can be quantified conveniently in a short time without resort to any skills. This method comprises reacting a target nucleic acid with a labeled probe comprising a labeled nucleic acid hybridizable with the target nucleic acid, a non-labeled probe comprising a nucleic acid having a base sequence complementary to a region, which is different from the region to be hybridized with the labeled probe, in the above-described target nucleic acid, and a solid probe in which a nucleic acid having a base sequence complementary to a region, which is different from the region to be hybridized with the labeled probe, in the above-described target nucleic acid is bonded to a support, and then measuring the label of the above-described labeled probe bonded to the above-described support. The terminal region of the region to be hybridized with the non-labeled probe overlaps with the terminal region of the region to be hybridized with the solid probe.

(57) 要約: 熟練した技術を要することなく、簡便に短時間でSNPの検出や標的核酸の定量を行うことができる標的核酸の測定方法が開示されている。本発明の方法では、標的核酸と、該標的核酸とハイブリダイズする、標識された核酸から成る標識プローブと、前記標的核酸内の領域であって前記標識プローブがハイブリダイズする領域とは異なる領域と相補的な塩基配列を有する核酸から成る非標識プローブと、標的核酸内の領域であって前記標識プローブがハイブリダイズする領域とは異なる領域と相補的な塩基配列を有する核酸が支持体に結合されて成る固相化プローブ

[続葉有]

WO 03/083106 A1



(74) 代理人: 谷川 英次郎 (TANIGAWA, Hidejiro); 〒102-0072 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階 谷川国際特許事務所内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

標的核酸の測定方法及びそのためのキット

技術分野

本発明は、標的核酸の測定方法及びそのためのキットに関する。本発明の方法
5 は、一塩基変異多型(SNP)の検出や遺伝子の接合型の判定に有用である。

背景技術

核酸の変異の判定は、単離した核酸を制限酵素によって切断し、ゲル（アガロ
ース、アクリルアミドなど）上で核酸断片を電気泳動によって検出する方法で行
われている。しかし、この手法は、制限酵素による核酸の切断に時間がかかり電
10 気泳動による手間が要する。さらに、発癌性のエチレンブロマイドを使用するた
め、その廃棄には特別の配慮を必要とする。

他に DNA シークエンス、DNA チップなどの技術による SNP 解析も行われている
が、熟練した技術の必要性やコストなどの欠点がある。

また、Cytometry 39: 131-140 (2000)に記載された方法は、標的核酸と、標的
15 核酸に相補的な蛍光色素標識プローブと、標識プローブに隣接した標的核酸と相
補的な塩基配列部分および粒子固相化プローブと相補的な塩基配列を持つプロー
ブをハイブリダイズし、ライゲースによるライゲーションを行い、次に粒子固相
化プローブとハイブリダイズさせ、粒子に結合した標識プローブの蛍光強度をフ
ローサイトメータで測定する方法である。二つのプローブの隣接配列に変異配列
20 が存在するとライゲーションは成立せず、粒子には標識プローブが結合せず、蛍
光は観察されない。その差を用い標的核酸の有無を判定する。この測定法はライ
ゲーション操作後、再度ハイブリダイゼーション操作を行うため時間がかかる欠
点を有する。

発明の開示

従って、本発明の目的は、熟練した技術を要することなく、簡便に短時間で S
25 NP の検出や標的核酸の定量を行うことができる標的核酸の測定方法を提供する
ことである。

本願発明者らは、鋭意研究の結果、標的核酸と、該標的核酸とハイブリダイズ

する固相化プローブ、および標識プローブとを反応させ、支持体に結合された標識を測定することにより標的核酸を測定する方法を採用するとともに、固相化プローブがハイブリダイズする領域の端部領域に、端部が重複する領域とハイブリダイズする非標識プローブをさらに反応させることにより、驚くべきことに、固相化プローブと標的核酸との反応の特異性が高まり、一塩基の相違も識別可能になることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、標的核酸と、標的核酸とハイブリダイズする、標識された核酸から成る標識プローブと、標的核酸内の領域であって前記標識プローブがハイブリダイズする領域とは異なる領域と相補的な塩基配列を有する核酸から成る非標識プローブと、標的核酸内の領域であって前記標識プローブがハイブリダイズする領域とは異なる領域と相補的な塩基配列を有する核酸が支持体に結合されて成る固相化プローブとを反応させ、前記支持体に結合された前記標識プローブの標識を測定することを含む標的核酸の測定方法であって、前記非標識プローブがハイブリダイズする領域の端部領域と、前記固相化プローブがハイブリダイズする領域の端部領域とが重複している、標的核酸の測定方法を提供する。また、本発明は、標的核酸又は標的核酸の一塩基変異多型を有する変異型核酸を含む被検試料に対して上記本発明の方法を適用し、測定結果から被検試料中の核酸が標的核酸か変異型核酸かを判定することを含む、一塩基変異多型の検出方法を提供する。さらに、本発明は、正常型遺伝子と、一塩基変異多型を含む異常型遺伝子とが対立遺伝子になっている、該遺伝子を含む被検試料に対して上記本発明の方法を適用し、測定結果から被検試料中の前記遺伝子の接合型を判定することを含む、遺伝子の接合型の判定方法を提供する。さらに、本発明は、前記標識プローブと、前記非標識プローブと、前記固相化プローブとを少なくとも含み、上記本発明の方法に用いられる核酸測定用キットを提供する。

本発明により、簡便に短時間で SNP の検出や標的核酸の定量を行うことができる標的核酸の測定方法が提供された。本発明の方法によれば、わずか 1 塩基の相違を識別することが可能であり、また、わずか 1 塩基の相違を有する対立遺伝子の接合型の判別が可能である。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の方法を説明するための模式図である。

図 2 は、本発明の実施例で用いた標的核酸及び各種プローブの塩基配列及びハイブリダイズする領域を示す図である。

5 図 3 は、非標識プローブの位置による蛍光強度の変化を示したグラフである（横軸の数字はFUT III DNAの塩基配列に対応する非標識プローブの位置を示し、カッコ内は非標識プローブの5'側と固相化プローブの3'側が重複する塩基数を現している）。

10 図 4 は、非標識プローブの添加の有無による経時的な蛍光強度の変化を示したグラフである。

図 5 は、標的核酸の遺伝子型（ホモ型、ヘテロ型）による蛍光強度の違いを示したグラフである。

発明を実施するための最良の形態

15 本発明の方法の一例を図 1 の A に示す模式図に基づき説明する。上述の通り、本発明の方法は、標的核酸 10 と、標識プローブ 12 と、固相化プローブ 14 と、非標識体プローブ 16 とをアニールすることにより、標的核酸 10 と、標識プローブ 12、固相化プローブ 14 及び非標識体プローブ 16 とをそれぞれハイブリダイズさせ、固相化プローブ 14 を固相化している支持体 18 に、標的核酸 10 を介して結合された標識プローブ 12 の標識 19 を測定することにより、被検試
20 料中の標的核酸 10 を測定するものである。

以下、各構成要素について詳細に説明する。標的核酸 10 は、測定しようとする核酸であり、何ら限定されるものではない。例として、ヒトやその他の生物のゲノミック遺伝子、cDNA、病原性の微生物やウイルスの遺伝子等を挙げることが出来るがこれらに限定されるものではない。本発明の方法は、一塩基の相違
25 さえ識別することができる特異性の高い方法であるので、SNP の検出に適用可能であるから、標的核酸が、このような SNP を検出しようとする核酸である場合には特に威力を発揮する。標的核酸は、DNA でも RNA でもよく、また、これらとハイブリダイズすることが可能な人工核酸であってもよい。標的核酸は、PC

Rのような核酸増幅法で増幅されたものであってもよいし、増幅されていない核酸であってもよい。なお、本明細書において、「測定」には、検出と定量の両者が包含される。標的核酸のサイズは、特に限定されないが、3種類のプローブとハイブリダイズする必要があるので、通常、40塩基以上、好ましくは60塩基以上のサイズを有する。標的核酸のサイズの上限は特にないが、通常、100～500塩基程度が好ましい。

標識プローブ12は、標的核酸内の一領域とハイブリダイズする核酸を標識したものである。標識プローブは、これがハイブリダイズする標的核酸内の領域（以下、「標識プローブハイブリダイズ領域」ということがある）と相補的な塩基配列を有していることが好ましいが、非標識プローブ及び固相化プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーション条件下において標的核酸とハイブリダイズできるものであれば、通常10%以下、特に5%以下程度の数の非相補的なヌクレオチドを含んでいてもよい。標識プローブのサイズは、特に限定されるものではなく、標的核酸の検出に有効なサイズを有していればよく、15塩基以上が好ましく、特に20～50塩基程度が好ましい。標識プローブに結合される標識は、プローブを測定できるものであればいずれのものであってもよく、従来の標識プローブに用いられているいずれの標識をも採用することができる。すなわち、蛍光標識、放射標識、酵素標識、ビオチン標識等を挙げることができる。これらのうち、高価な装置を用いることなく安全に測定可能で、標的核酸とのハイブリダイゼーションに干渉しない点から、蛍光標識が好ましい。標識は、プローブのどの部分に結合してもよく、このような結合は周知の方法により行うことができる。また、プローブは、DNAでもRNAでもよく、また、これらとハイブリダイズすることが可能な人工核酸であってもよい。

固相化プローブ14は、前記標的核酸10内の領域であって前記標識プローブハイブリダイズ領域とは異なる領域（以下、「固相化プローブハイブリダイズ領域」ということがある）と相補的な塩基配列を有する核酸を、支持体上に固相化したものである。固相化プローブのサイズは、特に限定されるものではなく、標的核酸の検出に有効なサイズを有していればよく、15塩基以上が好ましく、特

に20～50塩基程度が好ましい。支持体としては、核酸を固相化できるものであればいずれのものであってもよく、ポリスチレン粒子、ガラス粒子、ラテックス粒子等の粒子、これらにフェライト等を配合して磁力を与えた磁性粒子、マイクロプレートのウェルの内壁等を挙げることができる。固相化プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションが妨げられないように、支持体は核酸の末端に結合することが好ましい。核酸の支持体への固相化は、周知の方法により行うことができ、核酸を結合しやすいようにカルボキシル基等の官能基を表面に結合したポリスチレン粒子等が市販されているので、このような市販の核酸固相化用粒子を好ましく用いることができる。なお、固相化プローブ14の核酸は、支持体18に直接結合されていてもよいし、標的核酸とのハイブリダイゼーションに関与しない塩基配列を有するスペーサー領域を介して支持体に結合されていてもよい。このように、固相化プローブハイブリダイズ領域と相補的な配列を有する核酸が、スペーサー領域を介して間接的に支持体に結合されている場合も、本発明で言う「相補的な塩基配列を有する核酸が支持体に結合されて」いる場合に該当する。

非標識プローブ16は、標的核酸10内の、標識プローブハイブリダイズ領域とは異なる領域と相補的な塩基配列を有する核酸である。非標識プローブのサイズは、特に限定されるものではなく、標的核酸の検出に有効なサイズを有していればよく、15塩基以上が好ましく、特に20～50塩基程度が好ましい。

非標識プローブハイブリダイズ領域と、固相化プローブハイブリダイズ領域とは、互いの端部領域が重複している（以下、この重複している部分を「重複領域」と言うことがある）。重複領域は、図1のA中、参照番号20で示されている。重複領域のサイズは、特に限定されないが、1塩基～5塩基が好ましく、さらに1塩基～3塩基が好ましい。このような重複領域20を設けることにより、固相化プローブ14と標的核酸10との反応の特異性が高まり、一塩基の相違でも識別できるようになる。

本発明の方法は、標的核酸の変異型、とりわけSNPが存在する場合に、このような一塩基変異を区別して標的核酸を特異的に測定できるという優れた効果を発揮するものであるが、このような変異を区別して標的核酸を特異的に測定する場

合には、この変異が起きる部位が、固相化プローブハイブリダイズ領域中に位置するように、固相化プローブを設定する。変異している部位が、重複領域20から1塩基（重複領域の端部に隣接する）ないし5塩基離れた位置にあることが好ましい。なお、図1のA中、標的核酸10上の、変異する塩基の部位をYで示す。

- 5 また、Yに対合する固相化プローブ14内の塩基をXで示す。なお、本明細書の説明においては、標的核酸と変異している核酸を変異型と呼んでおり、変異型が必ずしも異常型を意味するわけではない。異常型の遺伝子の検出を目的にして異常型を標的核酸とする場合には、正常型が変異型になる。

- 10 なお、図1のAに示す例では、固相化プローブハイブリダイズ領域の5'末端領域と、非標識プローブハイブリダイズ領域の3'末端領域とが重複しているが、これとは逆に固相化プローブハイブリダイズ領域の3'末端領域と、非標識プローブハイブリダイズ領域の5'末端領域とが重複するようにこれらのプローブを設定してもよい（ただし、この場合には、固相化プローブの核酸の3'側が支持体に固相化される）。また、標識プローブハイブリダイズ領域は、非標識プローブ
15 ハイブリダイズ領域及び固相化プローブハイブリダイズ領域と重複しない任意の位置でよい。

- 上記の通り、本発明の方法では、標的核酸10と、標識プローブ12、固相化
プローブ14及び非標識プローブ16とをハイブリダイズさせるものであるが、
ハイブリダイゼーション反応は、これら4種類の核酸を同時に反応させてもよい
20 し、標的核酸10と、任意のプローブとを逐次的に反応させてもよいし、標的核酸10と、任意の2種類のプローブを反応させた後、第3のプローブを反応させてもよい。反応条件は、特に限定されず、プローブのサイズ等に応じて適宜選択されるが、標的核酸10と、固相化プローブ14と、非標識プローブ16とが共存する条件下におけるハイブリダイゼーション反応は、通常、30℃～60℃で
25 10分間以上であればよく、好ましくは、40℃～50℃で10分間～60分間程度行う。固相化プローブ14と非標識プローブ12のいずれかが存在しない条件下におけるハイブリダイゼーション反応は、上記の条件と同様に行うこともできるし、高温から低温に冷却する条件下で行ってもよい。例えば、下記実施例で

は、先に標的核酸 10 と、標識プローブ 12 と、非標識プローブ 16 とを反応させ、その後、固相化プローブ 14 を反応させているが、標的核酸 10 と、標識プローブ 12 と、非標識プローブ 16 との反応は、反応液を変性温度（95℃）から氷冷する条件下で行っている。高温から低温に冷却すると、ハイブリダイゼーションが起きる温度を必ず通過するので、標的核酸とプローブとをハイブリダイズさせることができる。

ハイブリダイゼーション反応後、支持体 18 に結合された標識 19 を測定する。標識 19 の測定は、各標識に応じた周知の方法により行うことができる。支持体 18 が粒子の場合には、支持体 18 を遠心分離や磁力（磁性粒子の場合）を用いて集めた後、標識を測定する。被検試料中に標的核酸 10 が存在する場合、標識プローブ 12 は標的核酸 10 及び固相化プローブ 14 の核酸部分を介して支持体 18 に結合され、標的核酸 10 が存在しない場合には、支持体 18 に結合されない。支持体 18 に結合された標識 19 を測定することにより、被検試料中の標的核酸 10 を検出することができる。また、支持体 19 に結合される標識 19 の量は、被検試料中の標的核酸 10 の量が多くなるほど多くなるので、標識 19 を定量することにより標的核酸 10 を定量することも可能である。

標的核酸又は標的核酸の一塩基変異多型を有する変異型核酸を含む被検試料に対して上記した本発明の方法を適用することにより、測定結果から被検試料中の核酸が標的核酸か変異型核酸かを判定することが可能である。これを図 1 の B を参照して説明する。図 1 の B 中、10' は、図 1 の A における標的核酸 10 内の塩基 Y が一塩基変異を起こした変異型核酸を示し、塩基 Y が変異した塩基を○で示す。このように、一塩基が変異した変異型核酸 10' と固相化プローブ 14 とは図 1 の B に示すようにハイブリダイズしないか、又は一部の固相化プローブ 14 がハイブリダイズするにしても、ハイブリダイズする固相化プローブの数が、標的核酸にハイブリダイズする固相化プローブの数よりも識別可能な程度に少なくなる。このため、支持体 18 に結合する標識の量が識別可能な程度に少なくなり、従って、被検試料中に含まれる核酸が、標的核酸か変異型かを判定することができる。

さらに、正常型遺伝子と、一塩基変異多型を含む異常型遺伝子とが対立遺伝子になっている、該遺伝子を含む被検試料に対して上記本発明の方法を適用することにより、測定結果から被検試料中の前記遺伝子の接合型を判定することが可能になる。従って、本発明の方法により、目的の遺伝子が、ホモ接合かヘテロ接合かを判定することが可能になる。標的核酸がホモ接合になっている場合に測定される標識量が最も多く、標的核酸と変異型とがヘテロ接合になっている場合が次に多く、変異型がホモ接合になっている場合が最も少ない。従って、本発明の方法に従って、支持体に結合された標識量を測定することにより、対立遺伝子の接合型を判定することが可能になる。

本発明は、また、前記標識プローブと、前記非標識プローブと、前記固相化プローブとを少なくとも含み、上記本発明の方法に用いられる核酸測定用キットをも提供する。これらの構成要素は先に説明した通りである。キットは、さらに反応に用いる緩衝液等を含んでいてもよい。

実施例

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。

標的核酸であるフコース転位酵素 3 (FUTIII) 遺伝子

FUTIII 遺伝子は糖鎖末端にフコースを転移して血液型抗原や癌関連抗原 (CA19-9) の合成に関係している遺伝子で、野生型 (WT) と変異型 (Le1、Le2、Le3) の 4 種類が知られている。変異の部位として 59、508、1067 番目の塩基が知られている。(Cancer Res. 58, 512-518(1998), 蛋白質 核酸 酵素 Vol.43 No.16 (1998))

1. 標的核酸の調製

各 FUTIII 遺伝子を鋳型として用い、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション (PCR) 法 (94°C, 1 分間、55°C, 1 分間、72°C, 1 分間を 30 サイクル) にてそれぞれの核酸を増幅し、精製 (MO BIO : ULTRA CLEAN DNA Purification kit : Catalog #12100-300) 後に A260 にて吸光度より濃度を測定して調製を行った。以下に各変異部分を含む核酸の増幅に用いたプライマーの組み合わせを示す。59 番目の塩基の変異部分を標的とした核酸 (WT<59>または Le<59>) は、センス側を 1 から 2

0 番目<atggatcccctgggtgcagc : 20mer>、アンチセンス側を 180 から 200 番目<ag
caggatcaggagggtggg : 20mer>のプライマーを用いて 1 から 200 番目<200bp>まで
を増幅し、508 番目の塩基の変異部分を標的とした核酸 (WT<508>または Le<508>
) は、センス側を 407 から 431 番目<acttgagaccacccccaactgcca : 25mer>、アン
チセンス側 588 から 612 番目 <tgagtccggcttccagttggacacca : 25mer>のプライマ
5 ーを用いて 407 から 612 番目<206bp>までを増幅し、1067 番目の塩基の変異部分
を標的とした核酸 (WT<1067>または Le<1067>) は、センス側 887 から 906 番目<
tccagagccccaaggacctg 20mer>、アンチセンス側 1086 から 1068 番目<tcaggtgaac
caagccgct 19mer>のプライマーを用いて 887 から 1086 番目<200bp>までを増幅し
10 た。

2. 固相化プローブの調製

FUTIII 遺伝子の塩基配列に相補的かつ変異の出現する位置を 3' 末端側から 4
から 6 塩基目にくるようにプローブを設計し、5' 末端にアミノ基を結合させた
固相化用プローブ (図 2 の a, b, c, d の塩基配列 4 : 20mer、配列番号 7, 10, 11,
15 16) (アマシャム バイオサイエンス社) を作製し、粒子へ固相化した (固相化粒
子)。

粒子は、径が $5.5\mu\text{m}$ の表面にカルボキシルが修飾されたポリスチレン粒子 (Bangs Laboratories, Inc. Catalog Code : PC06N, Polymer Description : P(S/5.5%DVB/5%MMA)) を使用した。

20 固相化プローブの粒子への固相化は、約 10^8 個粒子を 0.1M MES (2-[N-モルホリ
ノ]エタンスルホン酸) (pH4.5) $25\mu\text{l}$ に懸濁し、固相化用プローブ (約 100pmo
l/ μl) $5\mu\text{l}$ および EDC (1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド
・塩酸塩) (10mg/ml) $1.25\mu\text{l}$ を添加して 37°C 、1 時間反応 (粒子のカルボキ
シル基と固相化用プローブのアミノ基との縮合反応) させることで固相化粒子を
25 作製し、0.02% Tween20 (商品名) 溶液で洗浄し、0.1% SDS 溶液洗浄後、0.1M M
ES (pH4.5) 溶液に置換し 4°C で保存した。

3. 非標識プローブの調製

試料核酸と固相化したプローブとのハイブリダイズにおいて、非標識プローブ

を固相化プローブの3'側のどの位置に配置するか記載する。固相化プローブの3'側の塩基配列と非標識プローブの5'側の塩基配列が1塩基離れたプローブから3塩基重複するプローブ(約20mer)(アマシャム バイオサイエンス社)を調製した(図2のa, b, c, dの塩基配列3、配列番号2~6, 9, 12, 15)。

5 4. 標識プローブの調製

固相化プローブおよび非標識プローブと重複しない標的核酸と相補的な配列を持つプローブでこのプローブの5'側に蛍光(CY3)標識したプローブ(アマシャム バイオサイエンス社)を調製した(図2のa, b, c, dの塩基配列2、配列番号1, 8, 13, 14)。

10 5. 測定方法

試料核酸(800fmol)、非標識プローブ(50pmol)と標識プローブ(1pmol)の入った水溶液(全量10 μ l)を熱変性(95 $^{\circ}$ C; 5分間)し、氷上(1分間)で冷却後、固相化粒子(10 μ lの10 \times SSCに懸濁させた約10万粒子、最終濃度5 \times SSC)を添加し、標的核酸とハイブリダイズ(40 $^{\circ}$ C; 2時間、但し、経時的な検討では0~2時間)させ、遠心(15000rpm, 2分間)し反応液を除去した。その後、TBS-Triton(10mM Tris-Cl, 0.2% NaCl, 0.1% NaN₂, 0.01% TritonX-100, pH7.2) 50 μ lで洗浄し、再び遠心して測定用の緩衝液(Beckman Coulter 社、フローサイトメトリー専用シース液、P/N8599600) 200 μ lに懸濁、フローサイトメーター(Beckman Coulter 社、EPICS-PROFILE II)を用いて粒子上の蛍光強度を測定し、その蛍光強度より標的核酸の有無を同定した。

20 6. 非標識プローブの位置

FUTIII 遺伝子の野生型(図2-a中1:WT<59>; 1~200の200bp)を標的とする核酸とし、固相化粒子にはFUTIII 遺伝子の56番目から75番目の配列に対応するアンチセンス側の配列(図2-a中4)を有するプローブを用い、プローブの5'側と固相化粒子のプローブの3'側と異なる塩基の重複数を持つ非標識プローブ(図2のa中3、配列番号2~6)と標識プローブ(図2-a中2)を用い検出を試みた。固相化プローブの3'側の塩基と非標識プローブの5'側の塩基が1から3塩基が重複した時、標的核酸ではない変異型(図2-b中1:Le<59>; 1~200の20

0bp) の蛍光強度にはほとんど変化が観察されなかったにもかかわらず標的核酸である WT<59>には蛍光強度の上昇が観察された。ことから、固相化プローブの 3' 側の塩基と非標識プローブの 5' 側の塩基が 1 から 3 塩基重複させることで特異的なハイブリダイズの向上する効果があることが示された (図 3)。

5 7. 非標識プローブの効果

FUTIII 遺伝子の 1067 番目の変異遺伝子 (Le<1067>; 887~1086 の 200bp) を標的核酸とし、固相化粒子のプローブの配列を FUTIII 遺伝子の 1062 番目から 1081 番目のアンチセンス側 (tgaaccaagccgctttgctg、配列番号 16)、非標識プローブを固相化プローブの 3' 側と 3 塩基重複するアンチセンス側のプローブ (ctgcgcaccgtctggtacct、配列番号 15) と標識プローブ (gcaggccttgacagaaatccag、配列番号 14) (図 2 の d) を用いて検討した。試料核酸に非標識プローブを添加することで経時的に標的とする核酸の蛍光強度が、非標識プローブを添加しない試料に比べ蛍光強度の急激な上昇が観察された (図 4)。一方、標的ではない野生型 (WT<1067>; 887~1086 の 200bp) の核酸では蛍光強度に変化は観察されなかった。非標識プローブが標的とする核酸と固相化粒子との特異的なハイブリダイズの効率を改善していることが示された。

8. 標的核酸の検出

FUTIII 遺伝子には、各遺伝子型のホモ型とヘテロ型が存在する。そこで標的核酸のホモおよびヘテロの判定が可能であるか記載した。

FUTIII 遺伝子の 59 番目の変異核酸を標的核酸とした時 (図 2 の b 中 1) 蛍光強度は (Le<59>/Le<59>) > (WT<59>/Le<59>) > (WT<59>/WT<59>) (図 5 の a)、508 番目の変異核酸を標的核酸とした時 (図 2-c-1) (Le<508>/Le<508>) > (WT<508>/Le<508>) > (WT<508>/WT<508>) (図 5 の b)、1067 番目の変異核酸を標的核酸とした時 (図 2-d-1)、(Le<1067>/Le<1067>) > (WT<1067>/Le<1067>) > (WT<1067>/WT<1067>) (図 5 の c) となった。(用いた標識体 (CY3) プローブ、非標識プローブおよび固相化用プローブの塩基配列は図 2 の b, c, d を参照)

蛍光強度の大きい方から、標的とする核酸のホモ型、標的とする核酸と標的としない核酸のヘテロ型、標的としない核酸のホモ型の順となり、標的核酸の有無

および遺伝子型（ホモ、ヘテロ）の判断が可能であった。

なお、図2のa, b, c, d中の各参照番号の意味するところを以下にまとめて示す。

例えば、図2のa中の1を「a-1」のように記載する。

a-1 : 標的核酸、野生型 (WT (59))

5 a-2 : 標的核酸である WT (59) を検出するための CY3 標識プローブ

a-3 : 非標識プローブの設計によって標的核酸 (a-1) と固相化プローブ (a-4) のハイブリダイズの特異性の変化を検討するために用いた非標識プローブ

a-4 : WT (59) の検出用固相化プローブ

10 b-1 : 標的核酸、変異型 (Le (59))

b-2 : 標的核酸である Le (59) を検出するための CY3 標識プローブ

b-3 : 標的核酸 (b-1) と固相化プローブ (b-4) のハイブリダイズの特異性を高めるために添加する非標識プローブ

b-4 : Le (59) の検出用固相化プローブ

15 c-1 : 標的核酸、変異型 (Le (508))

c-2 : 標的核酸である Le (508) を検出するための CY3 標識プローブ

c-3 : 標的核酸 (c-1) と固相化プローブ (c-4) のハイブリダイズの特異性を高めるために添加する非標識プローブ

c-4 : Le (508) の検出用固相化プローブ

20 d-1 : 標的核酸、変異型 (Le (1067))

d-2 : 標的核酸である Le (1067) を検出するための CY3 標識プローブ

d-3 : 標的核酸 (d-1) と固相化プローブ (d-4) のハイブリダイズの特異性を高めるために添加する非標識プローブ

d-4 : Le (1067) の検出用固相化プローブ

請求の範囲

1. 標的核酸と、該標的核酸とハイブリダイズする、標識された核酸から成る標識プローブと、前記標的核酸内の領域であって前記標識プローブがハイブリダイズする領域とは異なる領域と相補的な塩基配列を有する核酸から成る非標識プローブと、標的核酸内の領域であって前記標識プローブがハイブリダイズする領域とは異なる領域と相補的な塩基配列を有する核酸が支持体に結合されて成る固相化プローブとを反応させ、前記支持体に結合された前記標識プローブの標識を測定することを含む標的核酸の測定方法であって、前記非標識プローブがハイブリダイズする領域の端部領域と、前記固相化プローブがハイブリダイズする領域の端部領域とが重複している、標的核酸の測定方法。
2. 重複している領域の塩基数が1塩基ないし5塩基である請求項1記載の方法。
3. 重複している領域の塩基数が1塩基ないし3塩基である請求項2記載の方法。
4. 前記非標識プローブの5'末端領域がハイブリダイズする領域と、前記固相化プローブの3'末端領域がハイブリダイズする領域とが重複している請求項1ないし3のいずれか1項に記載の方法。
5. 標的核酸の変異型が存在し、変異している部位が、前記固相化プローブがハイブリダイズする領域内に位置する請求項1ないし4のいずれか1項に記載の方法。
6. 前記変異している部位が、前記重複している領域から1塩基ないし5塩基離れた位置にある請求項5記載の方法。
7. 標的核酸又は標的核酸の一塩基変異多型を有する変異型核酸を含む被検試料に対して請求項1ないし6のいずれか1項に記載の方法を適用し、測定結果から被検試料中の核酸が標的核酸か変異型核酸かを判定することを含む、一塩基変異多型の検出方法。
8. 正常型遺伝子と、一塩基変異多型を含む異常型遺伝子とが対立遺伝子になっている、該遺伝子を含む被検試料に対して請求項1ないし6のいずれか1項に

記載の方法を適用し、測定結果から被検試料中の前記遺伝子の接合型を判定することを含む、遺伝子の接合型の判定方法。

9. 前記標識プローブと、前記非標識プローブと、前記固相化プローブとを少なくとも含み、請求項1ないし6のいずれか1項に記載の方法に用いられる核酸

5 測定用キット。

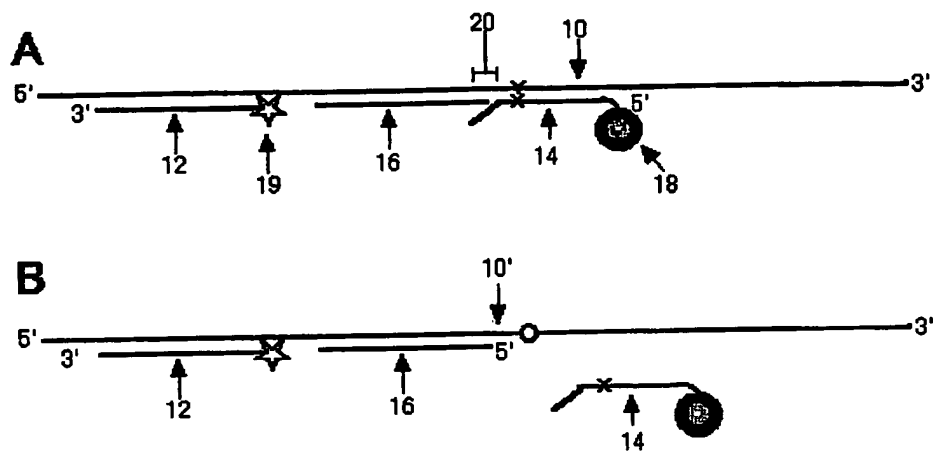


图 1

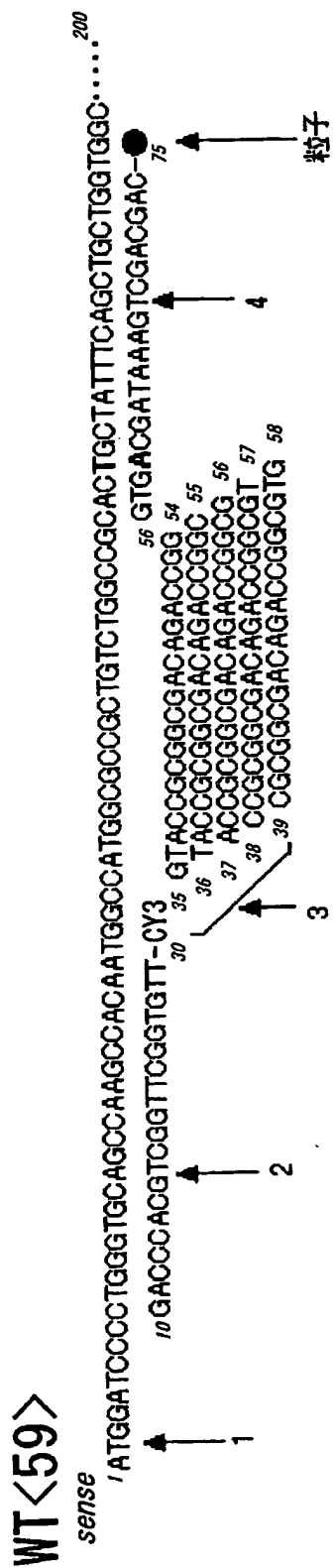


図 2 - a

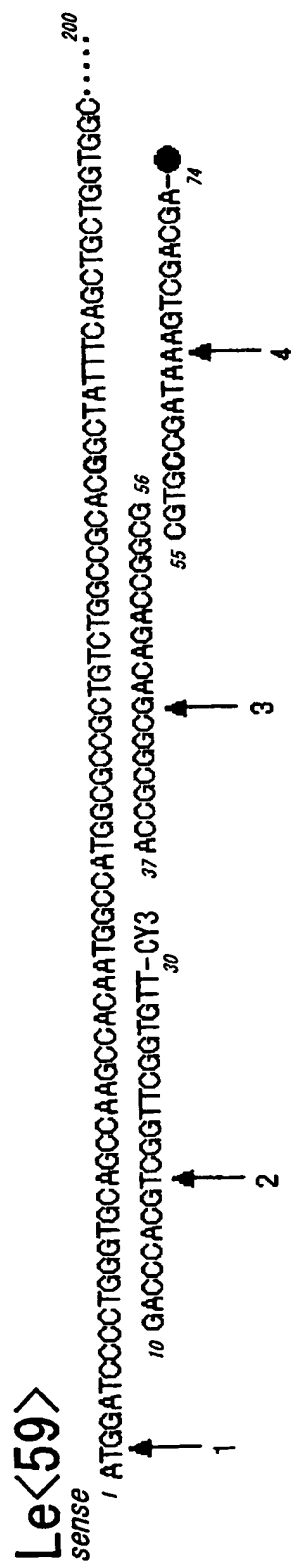


図 2 - b

Le<508>

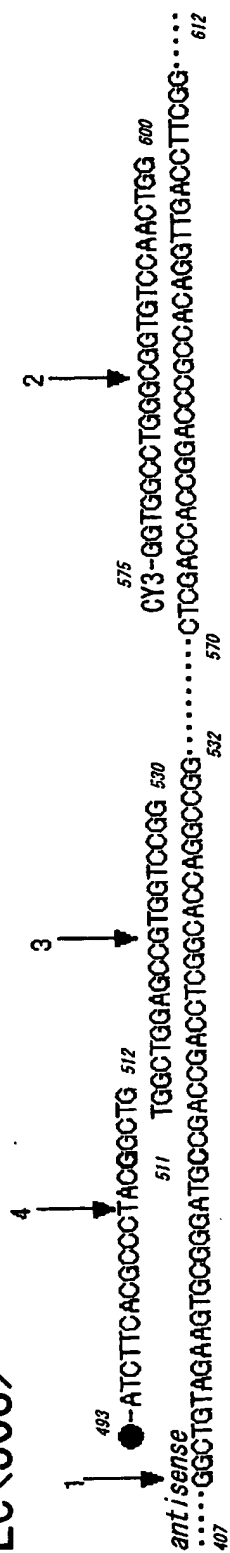


図 2 - 0

Le<1067>

sense
 887.....CACTGGATTCTGCAAGGCTGCTGGAACTGCAGCAGGAATCCAGGTACCAAGCGGTGCGCAGCAAGCGGCTTGTTTCACCTGA
 1086
 1003 GACCTAAGACGTTCCGGACG-CY3 1023
 1045 TCCATGGTCTGCCACGCGTC 1064
 1062 GTCGTTTCGCCGAACCAAGT- 1081
 1 2 3 4

図 2 - 1

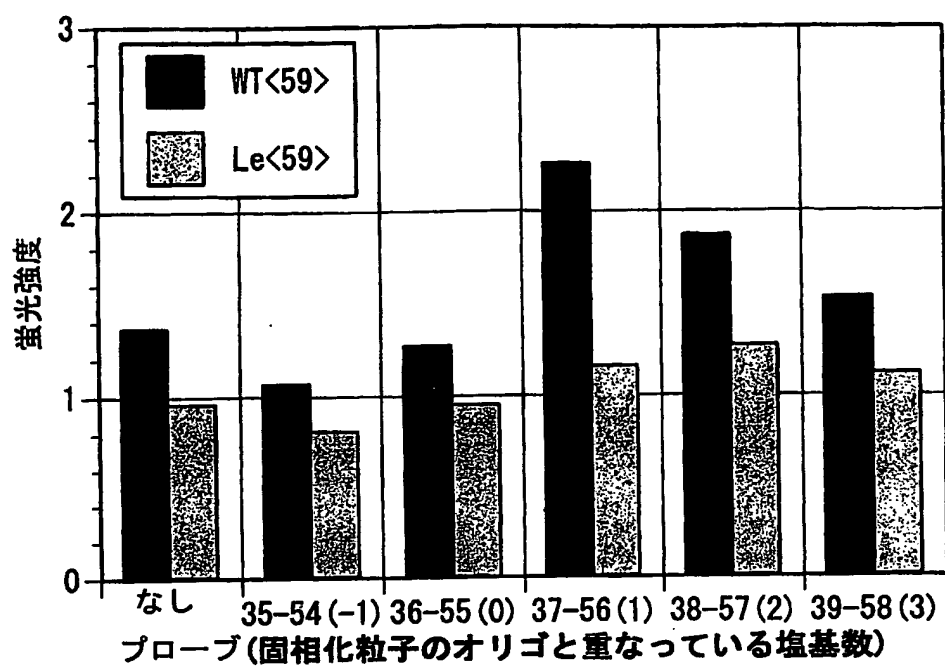


図 3

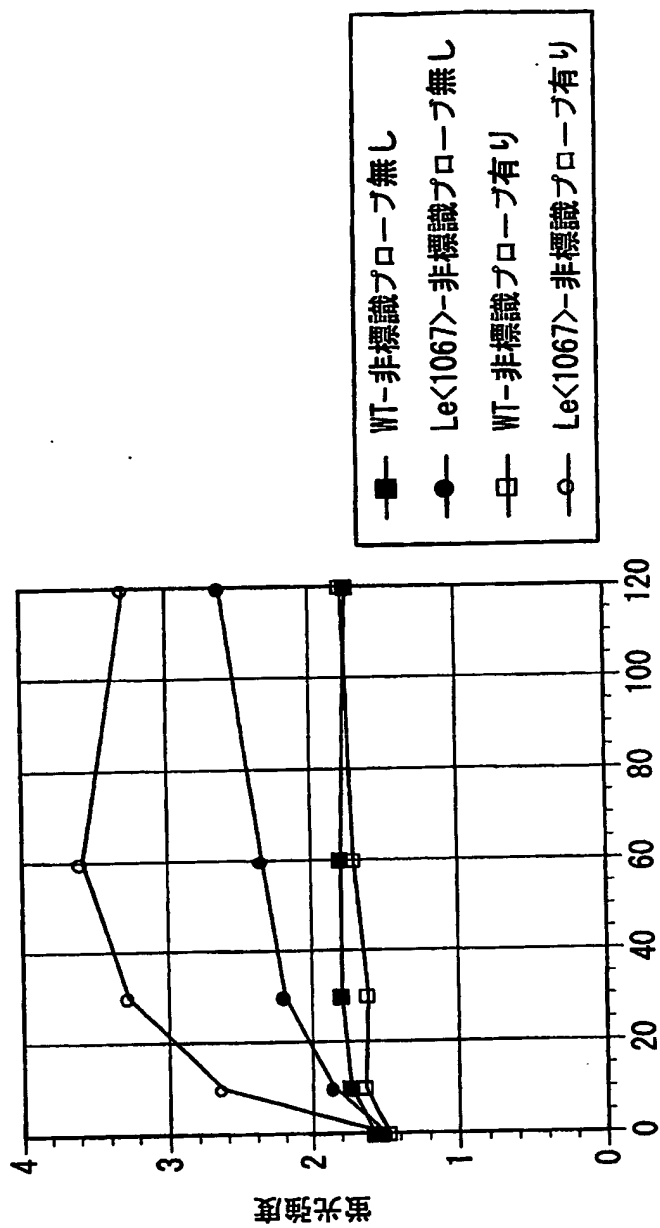


図 4

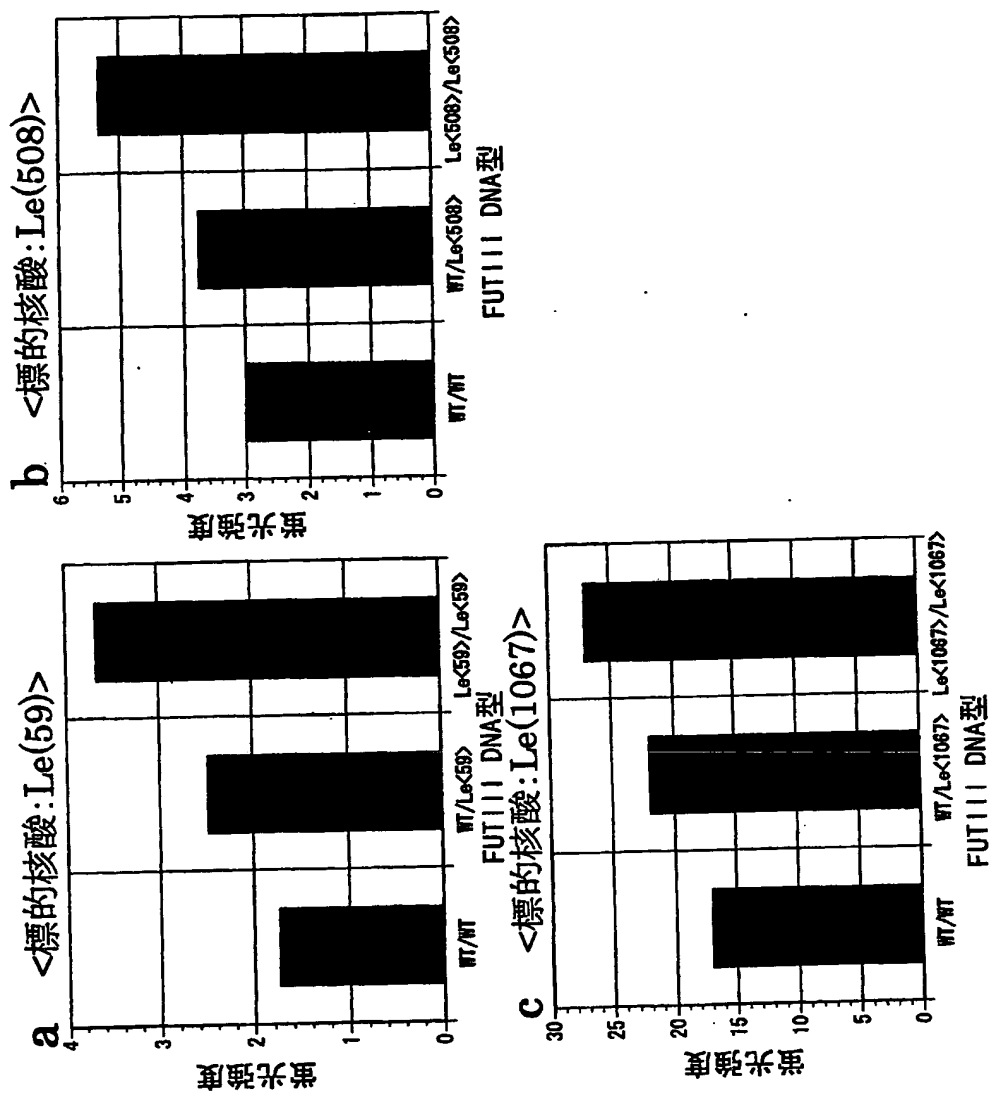


図5

1/10

SEQUENCE LISTING

<110> FUJIREBIO INC.

<120> Method for measuring nucleic acids and kit therefor

<130> 03PF260-PCT

<160> 28

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 1

ttgtggcttg gctgcaccca g

21

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 2

ggccagacag cggcgccatg

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

2/10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 3

cggccagaca gcggcgccat

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 4

gcggccagac agcggcgcca

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 5

tgcgccaga cagcggcgcc

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

3/10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 6

gtgcggccag acagcggcgc

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 7

cagcagctga aatagcagtg

20

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 8

ttgtggcttg gctgcaccca g

21

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

4/10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 9

gcggccagac agcggcgcca

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 10

agcagctgaa atagccgtgc

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 11

atcttcacgc cctacggctg

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

5/10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 12

tggctggagc cgtggtccgg

20

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 13

ggtggccttg gcggtgtcca actgg

25

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 14

gcaggccttg cagaaatcca g

21

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

6/10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 15

ctgcgcaccg tctggtacct

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide probe

<400> 16

tgaaccaagc cgctttgctg

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer used for PCR

<400> 17

atggatcccc tgggtgcagc

20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

7/10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer used for PCR

<400> 18

agcaggatca ggagggtggg

20

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer used for PCR

<400> 19

acttgagcc accccctaac tgcca

25

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer used for PCR

<400> 20

tgagtccggc ttccagttgg acacc

25

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

8/10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer used for PCR

<400> 21

tccagagccc caaggacctg

20

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer used for PCR

<400> 22

tcaggtgaac caagccgct

19

<210> 23

<211> 200

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

atggatcccc tgggtgcagc caagccacaa tggccatggc gccgctgtct ggccgcactg 60
ctatttcagc tgctgggtggc tgtgtgtttc ttctcctacc tgcgtgtgtc ccgagacgat 120
gccactggat cccctagggc tcccagtggg tcctcccgac aggacaccac tcccaccogc 180
cccaccctcc tgatcctgct 200

<210> 24

<211> 200

9/10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

```
atggatcccc tgggtgcagc caagccacaa tggccatggc gccgctgtct ggccgcacgg    60
ctatttcagc tgctgggtggc tgtgtgtttc ttctoctacc tgcgtgtgtc ccgagacgat    120
gccactggat cccctagggc tcccagtggg tcttcccgac aggacaccac tcccaccgcg    180
cccaccctcc tgatcctgct                                     200
```

<210> 25

<211> 206

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

```
acttggagcc accccctaac tgccagcacc tggaagccct ggacagatac ttcaatctca    60
ccatgtccta ccgcagcgac tccgacatct tcacgcccta cggctggctg gagccgtggt    120
ccggccagcc tgcccaccca ccgctcaacc tctcggccaa gaccgagctg gtggcctggg    180
cggtgtccaa ctggaagccg gactca                                     206
```

<210> 26

<211> 206

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

```
acttggagcc accccctaac tgccagcacc tggaagccct ggacagatac ttcaatctca    60
ccatgtccta ccgcagcgac tccgacatct tcacgcccta cagctggctg gagccgtggt    120
ccggccagcc tgcccaccca ccgctcaacc tctcggccaa gaccgagctg gtggcctggg    180
cggtgtccaa ctggaagccg gactca                                     206
```

10/10

<210> 27

<211> 200

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

tccagagccc caaggacctg gcccggtacc tgcaggagct ggacaaggac cacgcccgt	60
acctgagcta ctttcgctgg cgggagacgc tgcggcctcg ctccttcagc tgggcactgg	120
atttctgcaa ggctgctgg aaactgcagc aggaatccag gtaccagacg gtgcgcagca	180
tagcggcttg gttcacctga	200

<210> 28

<211> 200

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

tccagagccc caaggacctg gcccggtacc tgcaggagct ggacaaggac cacgcccgt	60
acctgagcta ctttcgctgg cgggagacgc tgcggcctcg ctccttcagc tgggcactgg	120
atttctgcaa ggctgctgg aaactgcagc aggaatccag gtaccagacg gtgcgcagca	180
aagcggcttg gttcacctga	200

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/03953

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/00, C12Q1/68, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/00-90, C12Q1/00-70, G01N33/00-98

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), CA (STN),
GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Iannone MA, et al., "Multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping by oligonucleotide ligation and flow cytometry.", Cytometry, Vol.39, No.2, (2000), pages 131 to 140	1-9
A	WO 01/27320 A1 (ITAKURA, M. et al.), 19 April, 2001 (19.04.01), & JP 2001-103970 A & EP 1221491 A1	1-9
A	WO 97/41256 A2, A3 (ABBOTT LAB.), 06 November, 1997 (06.11.97), & JP 2000-509278 A & EP 954603 A2 & US 5955268 A	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
30 April, 2003 (30.04.03)

Date of mailing of the international search report
20 May, 2003 (20.05.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N 15/00, C12Q 1/68, G01N 33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N 15/00~90, C12Q 1/00~70,
G01N 33/00~98

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), CA (STN),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Iannone MA, et al., " Multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping by oligonucleotide ligation and flow cytometry.", Cytometry, Vol. 39, No. 2, (2000), p. 131-140	1-9
A	WO 01/27320 A1 (ITAKURA M. et al.) 2001.04.19 & JP 2001-103970 A & EP 1221491 A1	1-9
A	WO 97/41256 A2, A3 (ABBOTT LAB.) 1997.11.06 & JP 2000-509278 A & EP 954603 A2 & US 5955268 A	1-9

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30.04.03

国際調査報告の発送日

20.05.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齊藤 真由美



4B

8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448